

Studi Produksi Plastik PHA dengan Pengaruh Penggunaan Media Minimal Cair dan Glukosa oleh *Ralstonia pickettii*

Putu Satwika Anggaswari Pujawati dan Refdinal Nawfa
Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia
e-mail: refnawfa@chem.its.ac.id

Abstrak—Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui tentang produksi Polihidroksialkanoat (PHA) oleh bakteri *Ralstonia pickettii*. Sistem fermentasi yang dilakukan dengan metode *batch* menggunakan media minimal cair dengan glukosa sebagai sumber karbon. Fermentasi dilakukan selama 68 jam pada suhu 37°C dan 150 rpm. PHA yang dihasilkan dikarakterisasi menggunakan *Fourier Transform Infrared* (FT-IR) untuk mengidentifikasi gugus fungsi. Sel bakteri dianalisis menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) untuk mengetahui morfologi permukaannya. Hasil penelitian ini didapatkan PHA berbentuk padatan putih sebanyak 14,53% berat sel kering. PHA yang didapatkan memiliki spektra FT-IR yang sesuai dengan spektra PHB komersial.

Kata kunci—Fermentasi; Bioplastik; PHA; *Ralstonia pickettii*

I. PENDAHULUAN

INDUSTRI polimer akhir-akhir ini mengalami peningkatan yang sangat drastis, utamanya digunakan sebagai bahan baku plastik sintetis. Plastik sintetis memiliki sifat yang kuat, ekonomis dan elastis serta dapat digunakan untuk berbadai kebutuhan. Akan tetapi, plastik sintetis juga memiliki kelemahan yakni membutuhkan waktu cukup lama untuk didegradasi oleh alam. Penggunaan plastik sintetis yang berlebihan akan merusak ekosistem dikarenakan menumpuk pada lapisan tanah [1].

Untuk mengurangi penggunaan polimer sintetis beberapa cara dilakukan seperti program 3R, *reduce, reuse, recycle*. Selain itu beberapa bahan polimer alami juga mulai dikembangkan. Polimer alami merupakan plastik yang dapat mengalami degradasi lebih cepat dibandingkan polimer sintetis. Penggunaan polimer alami dapat dimodifikasi secara fisik maupun kimia untuk memperbaiki sifat-sifatnya dan dapat didegradasi bila dibuang ke lingkungan [2]. Salah satu jenis polimer alami yang ramah lingkungan dan dapat didegradasi oleh mikroba yaitu polihidroksialkanoat (PHA).

Polihidroksialkanoat atau PHA adalah salah satu jenis bioplastik yang dihasilkan dari metabolisme mikroba yang memiliki sifat mirip dengan plastik sintetis dan dapat dimodifikasi sesuai dengan kebutuhan. Selain itu plastik berbahan PHA dapat terbiodegradasi sempurna oleh mikroba. PHA terbentuk dari cadangan karbon dan energi intraseluler

yang dihasilkan oleh beberapa jenis bakteri sebagai respon dari kondisi lingkungan yang tidak seimbang [3]. Bila dibandingkan dengan bioplastik jenis lain seperti protein, PHA memiliki kelebihan lain yaitu bersifat hidrofobik, resisten terhadap uap air dan permeabilitas oksigennya rendah. Dalam kehidupan sehari-hari PHA dapat diaplikasikan sebagai bahan *coating* (pelapis), kemasan, bahan sekali pakai serta keperluan operasi bedah seperti benang jahit, pembalut luka pemasangan tulang dan pembuluh darah.

Ralstonia merupakan salah satu jenis bakteri yang sedang banyak digunakan oleh peneliti. Saat ini terdapat 12 spesies *Ralstonia* yang telah teridentifikasi termasuk *Ralstonia pickettii* (*Genomes Online Database*, 2014). *R. pickettii* adalah salah satu spesies dari genus *Ralstonia* yang dijumpai pada daerah tercemar dan oligotropik. Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan, *R. pickettii* memiliki kemampuan mendegradasi polutan seperti toluena dan trikloroetilena hasil dari limbah industri. Selain itu, bakteri ini juga berkemampuan menghasilkan PHA yang dimanfaatkan sebagai cadangan energi tubuhnya pada kondisi lingkungan yang minimum nutrisi [4] [5].

Untuk melakukan biosintesis PHA melalui fermentasi dibutuhkan media serta sumber karbon agar bakteri dapat berkembang dengan baik. Media pertumbuhan bakteri terdapat beberapa jenis dengan komposisi yang berbeda-beda tergantung kebutuhan dari jenis bakteri yang digunakan. Sumber karbon yang digunakan juga bermacam-macam seperti glukosa, fruktosa, hemiselulosa, gliserol dan lain-lain [6]. Dalam beberapa penelitian bakteri *R. pickettii* yang telah dilakukan sebelumnya, media yang digunakan seperti *Nutrien Broth* pada jurnal milik Asranudin, 2014 menghasilkan PHA 20% per bobot biomassa kering. Sedangkan *nutrien media* yang mengandung *yeast extract* dan manitol pada jurnal milik Saito, 2006 menghasilkan PHA 40% per berat biomassa kering [7].

Telah diketahui bahwa beberapa bakteri dapat hidup dalam kondisi yang minimal nutrisi termasuk bakteri *R. pickettii*. Pada penelitian ini digunakan media minimal nutrisi sebagai media tanam untuk mengetahui pertumbuhannya dalam kondisi minimal dan pengaruhnya terhadap produksi PHA. Dalam penelitian ini digunakan glukosa sebagai sumber karbon dimana glukosa merupakan gula yang dapat digunakan dalam

metabolisme tubuhnya yang dapat menghasilkan produk primer maupun sekunder. PHA termasuk dalam produk sekunder dari metabolisme *R. pickettii*. Penggunaan glukosa sebagai sumber karbon dapat mempengaruhi hasil dari bioplastik yang diproduksi oleh bakteri. Berdasarkan penjelasan tersebut dalam penelitian ini dilakukan studi biosintesis PHA melalui proses fermentasi bakteri *R. pickettii* menggunakan media minimal dengan sumber karbon glukosa.

II. METODELOGI PENELITIAN

A. Pembuatan Media Cair

Media cair yang digunakan yaitu media minimal dan *Nutrien Broth*. Media minimal cair yaitu campuran garam M9 yang terdiri dari $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaCl , NH_4Cl , MgSO_4 , CaCl_2 , dan air destilat. Sebanyak 64g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15g KH_2PO_4 , 2,5g NaCl , dan 5,0g NH_4Cl dimasukkan kedalam 1000 ml air destilat kemudian diaduk hingga larut. Selanjutnya 700 mL air destilat dalam labu ukur dimasukkan 200 mL larutan campuran garam M9, 2 mL MgSO_4 1M, 100 μL CaCl_2 1 M dan labu ukur ditambahkan air kembali sampai tanda batas. Sedangkan untuk media *Nutrien Broth*, ditimbang sebanyak 20g kemudian dilarutkan kedalam 1 liter aquades.

B. Pembuatan Media Padat

Media padat yang digunakan yaitu *Nutrien Agar* dan media minimal padat. Untuk media minimal padat (agar) dibuat dengan 14,3 mL campuran garam M9 dalam 50 mL air destilasi. Setelah itu ditambahkan 143 μL MgSO_4 1M, 1,43 mL glukosa 3%, 7 μL CaCl_2 1 M dan 0,75 gram agar kemudian diaduk selama beberapa menit. Setelah itu disterilisasi dengan *autoclave* dan dituangkan kedalam plate. Sedangkan media *Nutrien Agar*, ditimbang 2g *Nutrien Agar* kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquades. Setelah itu disterilisasi menggunakan *autoclave* dan diletakkan dalam plate

C. Pertumbuhan Bakteri *R. pickettii*

Bakteri *R. pickettii* diinokulasi kedalam cawan petri yang berisi *Nutrien Agar* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dilakukan penumbuhan bakteri pada media minimal padat dengan menginokulasikan bakteri *R. pickettii* kedalam cawan petri yang berisi media minimal padat dan diinkubasi pada suhu 37°C.

Satu ose bakteri dari hasil pembiakan media minimal padat diaktifkan terlebih dahulu ke dalam 25 mL media minimal cair. Biakan selanjutnya dishaker dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Kemudian biakan dipindahkan ke media minimal cair 250 mL. Biakan bakteri diambil sebanyak 1 mL lalu diukur absorbansinya setiap 4 jam dengan spektrofotometer UV-VIS pada $\lambda = 600 \text{ nm}$. Apabila terjadi penurunan absorbansi maka pengukuran dihentikan. Dibuat kurva hubungan absorbansi dengan fungsi waktu.

D. Produksi PHA

Produksi PHA dari *R. pickettii* menggunakan media minimal cair serta glukosa sebagai sumber karbon. Sebanyak 10%

media kultivasi diambil sebagai prekultuur (24 jam, 120 rpm) sebelum ditumbuhkan pada media besar (250mL). Glukosa sebanyak 20 mL dengan konsentrasi 3 mg/L dimasukkan kedalam media kultivasi sebagai sumber karbon. Kultivasi dilakukan selama 68 jam dengan kecepatan 150 rpm (sesuai dengan kurva pertumbuhan yang memasuki fase stasioner).

E. Pemisahan PHA

Biomassa yang didapat dipisahkan dari cairan kultivasi dengan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm. Sel yang diperoleh lalu dicuci dengan akuades kemudian sel dikeringkan dengan *freeze dryer*. Sel yang telah kering ditimbang kemudian dilakukan ekstraksi menggunakan metanol: kloroform dengan perbandingan 1:2. Sebanyak 0,5 gram sel dicampurkan dengan 50 mL campuran metanol: kloroform dimasukkan kedalam labu bundar kemudian direfluks pada suhu 50°C selama 6 jam. Setelah proses refluks selesai, hasil disaring dan diuapkan filtratnya dengan *rotary evaporator*.

F. Karakterisasi Sampel

Karakterisasi sampel menggunakan *Fourier Transform Infrared* untuk mengetahui kandungan PHA melalui pendekatan gugus fungsi. Selain itu, dilakukan karakterisasi menggunakan *Scanning Electron Microscopy* untuk mengetahui morfologi sel *R. pickettii* yang mengandung PHA.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pertumbuhan Bakteri *R. pickettii*

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bakteri *R. picketti* yang diperoleh dari NBRC (*Nation Institute of Technology and Evaluation* 2-5-8 Kasuza-Kamatari Kisarazu-shi Chiba, Jepang). Bakteri ini bersifat autotrof sehingga membutuhkan oksigen dalam pertumbuhannya. Media pertumbuhan *R. pickettii* yaitu media agar (padat) dan media cair. Penanaman pada media agar bertujuan untuk meregenerasi sel serta mengetahui apakah bakteri dapat tumbuh pada media tersebut. Sedangkan penanaman pada media cair bertujuan untuk menggumpalkan biomassa yang nantinya digunakan pada proses selanjutnya.

Bakteri *R. pickettii* terlebih dahulu ditumbuhkan pada media minimal padat (agar). Sebelum digunakan, media minimal padat dilakukan sterilisasi terlebih dahulu agar tidak terjadi kontaminasi yang dapat mengganggu pertumbuhan dari bakteri *R. pickettii*. Pada saat diinokulasikan kedalam media minimal padat dan diinkubasi, setelah 24 jam lebih akan muncul koloni putih seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil pertumbuhan bakteri *R. pickettii* pada media agar
(A) media minimal padat (B) Nutrien Agar

Pada Gambar 1 (A) menunjukkan bahwa bakteri *R. pickettii* dapat tumbuh dengan baik pada media minimal padat. Hal ini ditunjukkan pada hasil koloni yang berwarna putih pada permukaan agar. Jika dibandingkan dengan Gambar 1 (B), koloni putih dihasilkan lebih tebal pada media *Nutrien Agar* dibandingkan pada media minimal padat. Ini disebabkan kandungan nutrisi pada *Nutrien Agar* lebih kompleks dibandingkan pada media minimal padat sehingga sel bakteri yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan dengan media minimal padat.

B. Produksi Biomassa

Biomassa bakteri *R. pickettii* diproduksi menggunakan metode fermentasi *batch*. Metode fermentasi *batch* yakni semua nutrisi dicampur langsung kedalam media pertumbuhan. Proses produksi biomassa *R. pickettii* diambil 10% media kultivasi sebagai prekultuur yang diinkubasi selama 24 jam. Hal ini bertujuan untuk mengadaptasi bakteri terhadap lingkungan media yang digunakan. Proses inkubasi dilakukan menggunakan *shaker incubator* yang bertujuan untuk memelihara bakteri pada jam tertentu dan menjaga kadar oksigen tetap ada di lingkungan media. Bakteri *R. pickettii* merupakan bakteri aerob sehingga keberadaan oksigen sangat diperlukan pada pertumbuhannya [4]. Prekultuur kemudian dipindah kedalam media kultivasi dengan volume 250 mL dan ditambahkan glukosa 5 mL dengan konsentrasi 3 mg/L. Inkubasi dilakukan selama 68 jam dengan kecepatan 150 rpm. Waktu inkubasi disesuaikan dengan waktu stationer bakteri karena pada waktu stationer ini jumlah sel yang hidup mencapai keadaan maksimum. Pada proses ini didapatkan media berubah warna dari tidak berwarna menjadi keruh (Gambar 2). Hal ini menandakan bahwa terdapat sel didalam media.



Gambar 2. Media hasil kultivasi sebelum inkubasi dan setelah inkubasi.

Hasil inkubasi kemudian di sentrifugasi untuk memisahkan

antara media dengan sel. Teknik sentrifugasi yaitu teknik pemisahan yang berdasarkan pada perbedaan berat molekul dari partikel. Partikel dengan berat molekul lebih besar akan terkumpul dibawah tabung. Hasil yang diperoleh berupa endapan berwarna putih dengan cairan supernatan yang tidak berwarna. Endapan putih berupa sel basah yang didapat sebanyak 0,1608 gram per liter media. Hasil yang didapat pada penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Asranudin (2014) yaitu 0,56 g/L. Hal ini disebabkan karena media yang digunakan berbeda dan kandungan nutrisi yang berbeda. Penelitian sebelumnya menggunakan *Nutrien Broth* yang didalamnya terkandung ekstrak daging dan ekstrak *yeast* sehingga sel yang dihasilkan lebih banyak.

C. Pemisahan dan Pemurnian PHA

Pemisahan PHA dari sel dilakukan dengan metode refluks yaitu mengekstrak sel menggunakan pelarut tertentu sehingga PHA dapat keluar dari sel. Biomassa kering sebanyak 0,2937 gram dihaluskan terlebih dahulu dengan mortar. Ini bertujuan untuk memperluas permukaan dari sel. Pelarut yang digunakan yaitu metanol:kloroform (1:2 v/v). Ekstraksi dilakukan selama 6 jam pada suhu 50°C kemudian dipisahkan antara filtrat dan residunya. Filtrat yang didapatkan kemudian dievaporasi sehingga didapatkan padatan PHA yang berupa serbuk berwarna putih seperti pada Gambar 3.



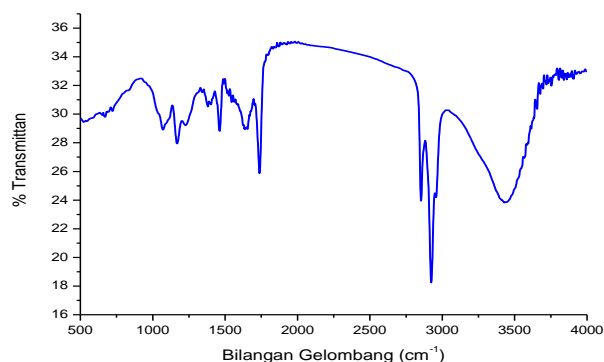
Gambar 3. Padatan PHA hasil evaporasi.

PHA yang didapat sebanyak 0,0427 gram dengan persen rendemen sebesar 14,53 % berat sel kering. Hasil ini berbeda dengan penelitian sebelumnya dengan rendemen sebesar 20% (Asranudin, 2014) dan 30% (Saito, Takahashi, & Terumi, 2006). Berbeda pula pada penelitian milik Martha dkk [8], pada penelitian ini media yang digunakan sama tetapi metode yang digunakan berbeda dan terdapat penambahan asam asetat dan asam propionate dihasilkan PHA 32,7%. Penambahan asam asetat dan asam propionat ini yang mempengaruhi banyaknya hasil PHA yang didapatkan. Hasil yang berbeda ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu teknik isolasi, bahan pengekstrak dan jenis substrat yang digunakan. Hasil PHA yang didapatkan kemudian dicuci dengan n-heksana untuk memurnikan dari lemak yang ikut terekstrak.

D. Karakterisasi Sampel

PHA yang telah dimurnikan kemudian dikarakterisasi menggunakan FT-IR. Tujuan dari penggunaan FT-IR adalah untuk mengetahui gugus fungsi yang terkandung dalam sampel sehingga dapat diperkirakan struktur molekulnya. Hasil spektra FT-IR dari PHA hasil produksi seperti pada Gambar 4.

Pada spektra FT-IR PHA hasil bakteri *R. pickettii* dapat dilihat bahwa terdapat 4 puncak yang dominan. Puncak yang didapatkan dari spektra sesuai dengan spektra IR PHB komersial yang telah dilaporkan oleh Galo dkk (2006). Gugus fungsi yang didapatkan pada spektra sesuai dengan gugus fungsi pada struktur PHA yang memiliki gugus fungsi C=O karbonil, C-O ester, C-H metil dan -OH. Berikut adalah tabel perbandingan hasil serapan puncak PHB komersial dengan hasil biosintesis.

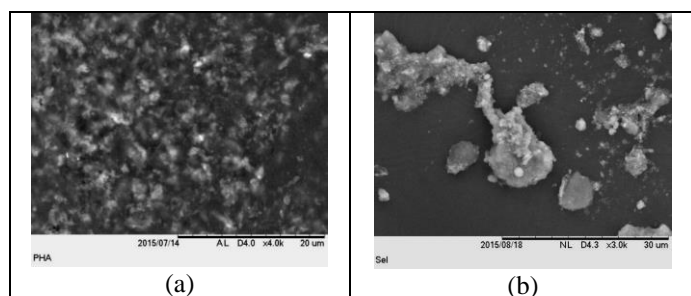


Gambar 4. Spektra FT-IR PHA *R. pickettii* dalam media minimal cair dengan substrat glukosa

Tabel 1. Tabel perbandingan puncak serapan FT-IR hasil *R. pickettii* dan PHB komersial.

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	
	PHA <i>R. pickettii</i>	PHB komersial
C-O-C	1168	1054
C=O ester	1737	1726
CH ₂ dan CH ₃	2852 dan 2924	2933 dan 2984
-OH	3429	3440

Untuk dapat melihat morfologi material yang didapat dilakukan pengamatan menggunakan SEM. Pada penelitian ini SEM digunakan untuk mengamati sel *R. pickettii* yang mengandung PHA dan yang tidak mengandung PHA. Sampel yang digunakan berupa sel bakteri yang sebelumnya telah dikeringkan menggunakan metode *freeze-dry*.



Gambar 5. Hasil Pengamatan menggunakan SEM sel *R. pickettii* (a) sel kering mengandung PHA (b) sel kering setelah lisis.

Pada Gambar 5 (a) menunjukkan bahwa biomassa sel mengandung PHA yang ditunjukkan dengan adanya granula

berwarna putih. Setelah proses ekstraksi, PHA akan terekstrak keluar dari sel yang menyebabkan struktur sel mengalami perubahan dan jumlah granula putih berkurang seperti pada Gambar 5 (b).

IV. KESIMPULAN

Adapun kesimpulan yang didapat dari penelitian ini yaitu:

- 1) PHA yang didapat berupa padatan berwarna putih.
- 2) Penggunaan media minimal cair dan glukosa mempengaruhi jumlah hasil produksi PHA yang dihasilkan.
- 3) PHA yang didapatkan sebesar 14,53% berat sel kering lebih sedikit dibandingkan menggunakan media lain seperti media *Nutrien Broth* 20% berat sel kering (Asranudin & Putra, 2014), media yang mengandung *yeast extract* dan manitol 40% berat sel kering (Saito, Takanashi, & Terumi, 2006) dan media minimal dengan penambahan asam asetat dan asam propionat 32,7% berat sel kering (Aznury, Setiadi, & Pancoro, 2010)

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada dosen pembimbing Drs. Refdinal Nawfa, M.S. dan Prof. Dr. Drs. Surya Rosa Putra, MS. Penulis juga mengucapkan terima kasih atas semua doa, dukungan dan bantuan yang telah diberikan kepada penulis selama proses pengerjaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Asranudin, & Putra, S. R. (2014). Efek Penambahan PEG 400 Pada Plastik PHA yang Diproduksi dari *Ralstonia pickettii*. *Prosiding Seminar Nasional Kimia* (pp. 90-102). Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya.
- [2] Syamsu, K., Hartoto, L., Fauzi, A. M., & dkk. (2007). Peran PEG 400 Dalam Pembuatan Lembaran Bioplastik Polihidroksialkanoat Yang Dihasilkan Oleh *Ralstonia eutropha* Dari Substrat Hidrolisat Pati Sagu. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 63-68.
- [3] Atifah, N., Syamsu, K., & Suryani, A. (2007). Kajian Fermentasi Bioplastik Poli-(3-Hidroksialkanoat) (PHA) Oleh *Ralstonia eutropha* Menggunakan Sumber Karbon Hidrolisat Pati Sagu. *Jurnal Teknologi Pertanian vol. 8 no. 3*, 160-171.
- [4] M.P.Ryan, J. P. (2007). *Ralstonia pickettii* in Environmental Biotechnology: Potential and Applications. *Journal of Applied Microbiology*, 754-764.
- [5] Ryan, M., Pembroke, J., & Adley, C. (2007). *Ralstonia Pickettii* in Enviromental Biotechnology: Potential and Application. *Journal of Applied Microbiology*, 754-764.
- [6] Kim, E.-J., & Kim, K.-J. (2014). Crystal Structure and Biochemical Characterization of PhaA from *Ralstonia eutropha*, a polyhydroxyalkanoate-Producing Bacterium. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 124-129.
- [7] Saito, M. T. (2006). Characterization of Two 3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase in Poly(3-Hydroxybutyrate)-Degradable Bacterium, *Ralstonia pickettii* T1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 501-507.
- [8] Aznury, M., Setiadi, T., & Pancoro, A. (2010). Pengaruh Sumber Karbon Terhadap Produksi Bioplastik Polihidroksialkanoat (PHA) Dengan *Ralstonia eutropha*. *Jurnal Teknik Kimia Indonesia*, 28-32.